Vergleichende Untersuchungen zur Diagnostik von Mastitis-Streptokokken und -Staphylokokken

Max Hasenknopf

1968

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. h. c. Baier

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIAGNOSTIK VON MASTITIS-STREPTOKOKKEN UND -STAPHYLOKOKKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Max Hasenknopf
aus Habach

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. Johann Kalich
Referent: Prof. Dr. Walter Baier
Korreferent: Prof. Dr. Anton Mayr
Tag der Promotion: 29. 2. 1968

UNIV.
LEIDEN
NBL.

U N I - D r u c k , München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	LITERATUR	2
	I. Bakteriologische Untersuchungsmethoden für Streptokokken	2
	1. Bakterioskopische Untersuchung	2
	2. Kulturelle Untersuchungsmethoden	3
	a. Grundverfahren der Anzüchtung	3
	b. Anreicherung	4
	c. Selektive Anzüchtung	5
	d. Anwendung der CAMP-Reaktion in den verschiedenen Abwandlungen	8
	e. Ein Medium zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung	10
	II. Bakteriologische Untersuchungsmethoden für Staphylokokken	12
	1. Biochemische Differenzierung	12
	2. Kulturelle Untersuchungsmethoden	15
C.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
	1. Material und Methode	19
	2. Ergebnisse	22
D.	DISKUSSION	30
E.	ZUSAMMENFASSUNG	34
F.	LITERATURVERZEICHNIS	38

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0084

A. EINLEITUNG

Voraussetzung einer planmäßigen Mastitisbekämpfung ist eine einwandfreie bakteriologische Diagnose. Diese soll Aufschluß geben über Art und Ausbreitung von Mastitiserregern in einem Rinderbestand. Alle Abschnitte des Sanierungsprogramms, wie Prophylaxe und Therapie, beziehungsweise Ausmerzung, sind davon abhängig. In der Routinediagnostik besteht bei dem täglichen Materialanfall Interesse an bakteriologischen Untersuchungsverfahren, die mit ausreichender Sicherheit bei möglichst geringem Arbeits- und Zeitaufwand anwendbar sind.

Im Zuge dieser Bestrebungen wurden neuerdings Medien zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung von Mastitis-Streptokokken und koagulasepositiven Staphylokokken empfohlen. Diese Methoden sollen die Vorteile der diagnostischen Sicherheit und des geringen Arbeitsaufwandes in sich vereinigen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Brauchbarkeit dieser Anreicherungsmedien in der Routinediagnostik, vergleichend mit herkömmlichen kulturellen Methoden, überprüft werden.

B. LITERATUR

I. BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR STREPTOKOKKEN

1. Bakterioskopische Untersuchung

Die einfachste Form der bakteriologischen Milchuntersuchung ist die Beimpfung von 1 o/oiger Traubenzuckerbouillon mit Milchsediment. Nach 18 Stunden Bebrütung werden das Wachstum und die nach Gram gefärbten Bouillonausstriche bewertet. (HAUKE und SCHÖNHERR (33)).

Die Untersuchung von Milchsedimentausstrichen, die mit Anilinfarbstoffen gefärbt wurden, zum Nachweis eines erhöhten Zellgehaltes sowie von Bakterien ist jedoch ungenügend, wenn es sich darum handelt, in einem verseuchten Bestand mit Galtstreptokokken infizierte Kühe zu ermitteln. In den Präparaten kann man durchaus nicht immer Galtstreptokokken von anderen Streptokokken und Mikrokokken mit ausreichender Sicherheit unterscheiden (SCHÖNHERR (67)). Auch ein Untersuchungsverfahren, welches sich primär auf die zytologische Diagnose stützt und nur im Verdachtsfall eine kulturelle Untersuchung einschaltet, ist als zu unsicher abzulehnen (THIEME (75)). Die bakterioskopische Untersuchung von Eutersekreten, abgesehen von "typtischen Fällen", führt allein, ohne Zuhilfenahme des Kulturverfahrens, nicht oder nur sehr unvollkommen zum Ziel (ZURECK und DIETRICH (81)). Nur im höchsten Stadium der Erkrankung liefert die mikroskopische Untersuchung eindeutige Bilder. Hingegen treten im Anfangsstadium Galterreger häufig als Diplokokken in Erscheinung, und das Zellbild besagt noch nicht viel. Ebenso verhält es sich mit alten Galtfällen, bei denen ein Rückgang der Leukozytenzahl und ein Verschwimmen bzw. Undeutlichwerden der Erreger eintreten können (Galtschatten). In diesen Fällen ist die Bakterioskopie unzuverlässig und eine kulturelle Züchtung ratsam (SCHÖNHERR (67)).

Zur Frage des mikroskopisch nachweisbaren Eiters in der Milch, einem Begriff des Milchgesetzes, der heute noch die praktische Bedeutung besitzt, die er bei Inkrafttreten des Milchgesetzes vor etwa 30 Jahren hatte, schreibt LORENZEN (50): Der Befund von mikroskopisch nachweisbarem Eiter ist relativ selten. Er ist bei rund 10 o/o der Galtbefunde zu finden. Die Phagozytose tritt vorwiegend im akuten Stadium auf, in dem die Milch sowieso grobsinnlich verändert ist. Im chronischen Stadium vermißt man die Phagozytose fast immer. Vielfach ist in diesem Stadium der Erregernachweis nur durch das Kulturverfahren zu erbringen. Man findet in vielen Fällen weder polymorphkernige Leukozyten noch Lymphozyten oder gar Phagozytose und dennoch liegt eine Infektion vor (OBIGER (56)).

Die kulturelle Verarbeitung der Milch ist deswegen notwendig, weil der Erreger im Sedimentausstrich häufig nicht nachzuweisen ist. Auch wenn eine starke Verkeimung vorliegt, sind die Mastitiserreger mikroskopisch nicht immer im Zellausstrich zu finden (OBIGER (57)).

2. Kulturelle Untersuchungsmethoden

Grundverfahren der Anzüchtung

Die einzige Methode der sicheren Diagnosestellung zum Zweck der Behandlung und Tilgung der Mastitiden ist diejenige der Züchtung der Bakterien auf Nährböden (STABLEFORTH (71)), wobei zwei Gruppen von Verfahren zur Anzüchtung, die Schüttelkultur und die Züchtung auf der Agaroberfläche, zur Anwendung kommen. Die Schüttelkultur (Ausgießverfahren) wird vorwiegend mit normalem Nähragar und einem Zusatz von 5 o/o defibriniertem Rinderblut vorgenommen. Man kann hierbei die Hämolyse der im Nährboden wachsenden Kolonien am besten erkennen. Die Kolonien sind jedoch fast alle linsenförmig und lassen keine Unterscheidung zu. Ein Anhaltspunkt ist, daß Mikrokokken etwas langsamer wachsen als Streptokokken, deren Kolonien in der Regel schon nach 18 - 24 Stunden voll entwickelt sind.

Nachteil des Ausgießverfahrens ist aber seine Abhängigkeit von der in der Probe enthaltenen Bakterienmenge. Ist diese sehr groß, so entwickeln sich die dicht stehenden Kolonien infolge der Konkurrenz nicht gut. Bei geringem

Keimgehalt und geringer eingeimpfter Sekretmenge findet sich keine Kolonie auf der Platte. Daher werden für jede Sekretprobe mindestens zwei Platten, mit verschiedener Einimpfmenge benötigt, damit auf einer Platte brauchbare und charakteristische Kolonien erhalten werden (DIERNHOFER (19)).

Die in der Schweiz eingeführte, von STECK (72) empfohlene, Tiefenkultur ist arbeits- und materialsparender. Agarröhrchen zu 10 ccm werden vor dem Erstarren mit 0,5 ml Milch beschickt und umgeschwenkt, so daß die Konzentration zur Kuppe hin kontinuierlich abnimmt.

Bei dem Verfahren der Oberflächenkultur wird entweder das Sediment oder eine 2-mm-Öse der Milchprobe auf Nähragarplatten, die 5 o/o Rindervollblut oder 5 o/o gewaschene Rindererythrozyten enthalten, ausgestrichen und nach 24 Stunden Bebrütung ausgewertet. Eine Platte kann mit 4 Sedimenten bzw. Ösen aus den Milchproben beimpft werden. Mit dieser Methodik können mit einiger Sicherheit Galtstreptokokken, ß-hämolysierende Streptokokken und Staphylokokken voneinander unterschieden werden. Bei den Staphylokokken sind die Pigmentierung und die Art der Hämolyse gut zu beurteilen (HAUKE und SCHÖNHERR (33)).

Anreicherung

Wenn Milch nur sehr wenige Krankheitserreger enthält, so kann möglicherweise der geringe, für die Kultur verwendete Bruchteil der Probe keine Keime enthalten. Auch wächst nicht jeder lebende Keim auf der Agarplatte. Bei einem negativen Ergebnis im Anreicherungsverfahren kann dagegen eine Infektion mit ausreichender Sicherheit ausgeschlossen werden. Nach DIERHOFER (19) verwendet man am besten eine Traubenzuckerbouillon, in die man die Milchprobe schüttet. Nach 18 Stunden sind bereits reichlich Streptokokken zu finden, auch wenn sehr wenig Keime im Ausgangsmaterial waren.

Für die Anreicherungsmethoden gilt die Forderung, daß die Milchproben sehr sauber genommen werden müssen, da gleichzeitig die gesamte Keimflora der Milch angereichert wird. Nach STABLEFORTH (71) ist die beste Anreicherungsmethode, um eine Streptokokkeninfektion festzustellen, das

Bebrüten einer Milchmenge von 25 ml über Nacht, die dann auf Edwardsplatten gebracht wird. Bei negativem Ausfall besteht kein Zweifel darüber, daß Mastitiden bei den untersuchten Herden auszuschließen sind.

HOTIS und MILLER (38) gaben 1936 bekannt, daß sich bei der Bebrütung von Milch, die Streptococcus agalactiae enthielt, gewöhnlich ein Boden des Gläschens festhaftendes Sediment bildete und auch ohne Sedimentbildung an der Wand des Gläschen festhaftende Kolonien auftraten. UDALL, JOHNSON und FERGUSON (78) konnten die gleichen Feststellungen machen. RACKOW (60) gibt an, daß diese Erscheinungen zuerst von KLIMMER beschrieben wurden. Auf Grund dieser Beobachtung entstand ein neues Untersuchungsverfahren, genannt Hotistest. Vor der Bebrütung wird der Milch Bromkresolpurpur als Indikator zugesetzt, der bei einem pH-Wert von 5,2 gelb und bei einem pH-Wert von 7.0 purpurfarben ist. Streptococcus agalactiae erzeugt in der Milch Milchsäure und deshalb zeigen Sediment und Kolonien eine leuchtend gelbe Farbe. Andere Streptokokken bilden gewöhnlich keine Kolonien und weisen in der Produktion von Milchsäure keine so große Aktivität auf wie Streptococcus agalactiae (MILLER (52)). Das Auftreten von gelben Kolonien in Hotistest-Milch ist daher fast spezifisch für Streptococcus agalactiae (SCHALM (63)).

SCHALM und LEIDL (65) fanden bei der Untersuchung von 3336 Viertelgemelksproben mit dem Hotistest, daß er in einfacher Weise einen guten Überblick gestattet, ob und wie stark eine Herde mit Streptococcus agalactiae befallen ist. Eine peinlich saubere Gewinnung der Milchproben ist jedoch Voraussetzung. Beim Vergleich der Reaktionen des Hotistestes mit den Ergebnissen der kulturellen Untersuchungen auf der Blutplatte konnten die Untersucher feststellen, daß der Hotistest 89 o/o der auf Bluttryptoseagar diagnostifzierten Galtstreptokokken anzeigte.

Selektive Anzüchtung

Es wurde immer wieder versucht Elektivnährböden herzustellen, auf denen nicht interessierende Keime nicht wachsen sollen. KLIMMER, HAUPT und ROOTS (45) gaben eine Platte an, die durch einen Zusatz von 10 o/o Serumalkalialbuminat nährstoffreicher gemacht wird und durch 1 o/o Saccharose und eine entsprechende Menge Bromkresolpurpur als Indikator die Keime anzeigen soll, die Saccharose vergären. Galtstreptokokken bilden

soviel Säure, daß ihre Kolonien und der sonst violette Nährboden in der Umgebung intensiv gelb werden. DIERNHOFER (19) sieht den Wert des Nährbodens beeinträchtigt, da die Säurebildung aus Saccharose auch andere Arten, wenn auch nicht in gleicher Intensität, eigen ist. Manche Galtstreptokokken benötigen eine lange Anlaufzeit bis es zur Säurebildung kommt. TILGNER und SCHIERHOLZ (76) untersuchten mit dem Bromkresolpurpur-Saccharose-Indikatorsystem und bei Verwendung von Kristallviolett (BRYAN (7)) als Bakteriostatikum für Mikrokokken 1400 Milchproben. Nur 50 o/o der sich entwickelnden Streptokokkenkulturen bewirkten einen Farbumschlag von blau nach gelb. Außerdem konnte der Kristallviolettzusatz das Wachstum der unerwünschten Begleitflora nicht immer in ausreichendem Maße unterdrücken. Die Stoffwechselleistungen solcher Keime können ebenfalls zu einer positiven Reaktion des Indikators führen. Das Verfahren bringt demnach keine Verbesserung für die Erkennung einer Galtinfektion. Außerdem verlangt die Verwendung eines festen Nährbodens einen größeren Arbeits- und Materialaufwand als die Anzüchtung in Bouillon.

EDWARDS übernahm das von DIERNHOFER (18) eingeführte Aesculin, mit dem man die Streptokokken weiter differenzieren kann, und verwendete es mit dem Kristallviolett in seiner Blutplatte. Man konnte nun die aesculinvergärenden Streptokokken erkennen, die mit Ausnahme des Streptococcus uberis meist Schmutzkeime sind, sogenannte Enterokokken. Das EDWARDS-Medium wurde von PLASTRIDGE und SEREMET (59) und SLANETZ und NAGHSKI (70) als besonders gut befunden, Streptococcus agalactiae aus bebrüteter Milch zu finden. LITTLE und PLASTRIDGE (48) ersetzten später das Aesculin durch Mannit, Inulin und Sorbit. SCHALM (63) benützt dieses modifizierte Edwards-Medium zur Diagnose von Streptococcus agalactiae aus bebrüteten Milchproben.

PACKER (58) fand, daß auf Blutagar mit Kristallviolett (1 : 500 000) und Natriumazid (1 : 2000) zwar pathogene Streptokokken wachsen, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis und gramnegative Bakterien jedoch gehemmt werden. Die Verwendung dieses Nährbodens ist sehr beschränkt; außerdem neigt das Natriumazid dazu, die Erythrozyten zu hämolysieren und den Agar deshalb zu entfärben.

1933 schlug EDWARDS (22) einen flüssigen, selektiv wirkenden Nährboden zur Diagnose von Streptokokkenmastitiden vor. Das Medium bestand aus

Fleischbrühe (pH 7,4) mit einem Zusatz von 1 o/o Glukose, 5 o/o Serum und Kristallviolett 1 : 200 000. Röhrchen mit Sediment aus 10 ml Milchproben, die nach 24 Stunden Bebrütung Wachstum zeigten, wurden mikroskopisch untersucht und auf Blutplatten ausgestrichen. Später benutzte EDWARDS (23) Fleischextrakt (Lemco)-Bouillon mit 0,5 o/o Glukose, Kristallviolett 1 : 100 000 und Natriumazid.

MC KENZIE (42) berichtet 1941, daß eine Bouillon mit Thalliumacetat 1 : 1000, 0,5 o/o Glukose und Kristallviolett 1 : 200 000 einen höheren Prozentsatz an Streptokokken aufdeckte, als eine Bouillon mit Natriumazid in Parallelversuchen.

DIERNHOFER (19) hat längere Zeit einen Elektivnährboden ohne Zucker verwendet, der 0,18 o/o Natriumazid, Kristallviolett 1 : 500 000, 0,1 o/o Aesculin und 0,1 o/o Ferricitrat enthielt. Dieser Agar wurde vor dem Ausgießen mit etwa 20 o/o Vollblut versetzt und oberflächlich beimpft. Galtstreptokokken verändern diesen Nährboden überhaupt nicht und zeigen sich im UVLicht als bläulich-weiß leuchtende Knöpfchen. Die aesculinspaltenden Keime erzeugen mit dem Eisen eine braune Färbung wie im Edwards-Nährboden.

Bei dem Versuch, aesculinspaltende Streptokokken auszuschalten (Streptococcus uberis hat geringere Bedeutung und Enterokokken sind nur in wenigen Fällen als harmlose Euterbewohner festgestellt worden) fand VOGLER (79), daß der Zusatz von Lithiumchlorid (0,5 o/o) Galtstreptokokken nicht im geringsten behinderte, während Enterokokken durch 0,1 o/o bereits vollständig gehemmt wurden. Bei späterer praktischer Anwendung versagte aber das Lithiumchlorid.

LIVONI (49) bebrütet die Milchproben unter Zugabe von Kristallviolett 1 : 500 000 und Natriumazid 1 : 200 000 bei gleichzeitigem Zusatz von Bromthymolblau 1 : 2 500. Mit der so bebrüteten Milch wird darauf direkt der CAMP-Test durchgeführt. Die Säuerung der Milch, die allein wenig besagt, wird sinnvoll durch den Ausfall der CAMP-Reaktion ergänzt (OBIGER (57).

JASPER und DELLINGER (40) fanden einen selektiv wirkenden Kristallviolettagar zur Erkennung von Streptococcus agalactiae aus Direktkulturen. Sie

benützten ein Grundmedium, dem sie pro Liter 1 ml einer 1,6 o/oigen Bromkresolpurpurlösung hinzufügten, welche eine optimale Beobachtung der Säureproduktion erlaubte. Als selektiv wachstumsfördernd und -hemmend testeten sie Kristallviolett (12 Konzentrationen 1 : 500 000 bis 1 : 1500 000), Rosanoline (8 Konzentrationen 1 : 500 000 bis 1 : 1000 000), Thalliumacetat (9 Konzentrationen 1 : 3000 bis 1 : 100 000), Natriumazid (6 Konzentrationen 1 : 2000 bis 1 : 150 000), Beefextrakt 1,5 und 3 o/oig Hefeextrakt 1,5 und 3 o/oig und Pferdeserum 4 o/o bei pH-Werten von 6,8 - 7,4. 127 verschiedene Zusammensetzungen wurden untersucht. Das schließlich ausgewählte selektive Medium hatte folgende Zusammensetzung: Bacto-agar 15 g, Bacto-lactose 10 g, Proteose-peptone 5 g, Hefeextrakt 1,5 g, Beefextrakt 1,5 g, Pferdeserum 40 ml, 1,6 o/oiges Bromkresolpurpur 1 ml, Kristallviolett 1 : 1 x 10^6, Thalliumacetat 1 : 5 x 10^3. Straphylokokken, Mikrokokken, Bacillus cereus und Corynebacterium pyogenes wuchsen nicht auf dem Medium, coliforme Bakterien wurden zum Teil gehemmt und Pseudomonas wuchs selten. Die Kolonien von Streptococcus agalactiae waren charakterisiert durch ein dunkel pigmentiertes Zentrum, einem weißen Ring und einer gelben Zone von verschiedener Intensität je nach Säurebildung. Auf dem beschriebenen Medium wächst Streptococcus agalactiae gut und charakteristisch, aber nicht ausschließlich. Es hat sich gezeigt, daß es sehr gut brauchbar zur Erkennung von Streptococcus agalactiae aus Tank- und Kannenmilchproben ist.

Anwendung der Camp-Reaktion in den verschiedenen Abwandlungen.

Die Diagnosestellung des Gelben Galtes hat sich erst wesentlich verbessert seit der Entdeckung des lytischen Phänomens bei Streptococcus agalactiae durch die Australier CHRISTIE, ATKINS und MUNCH-PETERSEN (14). Der nach den Anfangsbuchstaben der Autorennamen bezeichnete CAMP-Test wird definiert als eine schalenförmige vollständige Hämolyse, die dort auftritt, wo Stoffwechselprodukte der Gruppe B-Streptokokken mit dem ß-Toxin von Staphylokokken in einer Blutplatte zusammentreffen. Die Camp-Reaktion wird in verschiedenen Abwandlungen angewendet. MUNCH-PETERSEN und CHRISTIE (55) haben galtverdächtige Kolonien mit Staphylokokken-ß-Toxin betropft und 2 Stunden bebrütet. Im Original- oder Platten-Camp-Test kann anstelle des Impfstriches eines ß-Toxin-Bildners auch ein mit sterilem Staphylokokken-ß-Toxin gefüllter Graben benützt

werden. Weitere Abwandlungen sind die Aesculin-Toxin-Platte und der Sun-CAMP-Test nach HOVMAND (39).

Im "Direkten CAMP" nach KRETZSCHMAR (46) wird das Ausgangsmaterial auf einfachen Hammelblutplatten ohne Traubenzucker angezüchtet. Milchsediment wird in verschiedener Verdünnung ausgestrichen und dazwischen werden die geeigneten Mikrokokken von einer gut bewachsenen Schrägagarkultur eingeimpft. Alle Nachteile des selektiven Hemmnährbodens fallen weg. Infolge der Verdünnungsstriche erhält man auch bei starkem sekundären Keimgehalt meist Einzelkolonien, welche auf Grund der Hämolyse unter dem Mikroskop gut zu betrachten sind. Auch bei erheblicher sekundärer Verunreinigung des Ausgangsmaterials gelingt noch der Nachweis der Galtstreptokokken, selbst wenn sie nur in geringer Zahl vorhanden sind.

Unter Ausnützung des CAMP-Phänomens haben HAUGE und KÖHLER-ELLINGSEN (32) den TKT-Nährboden (Thalliumsulfat-Kristallviolett-Toxin) entwickelt, einen Selektivnährboden für Streptokokken, dem das zur Hämopepsie führende ß-Toxin geeigneter Mikrokokkenstämme zugefügt ist. Darauf wachsen CAMP-positive Streptokokkenkolonien mit ß-Hämolyse, Galtstreptokokken außerdem infolge des Farbstoffzusatzes taubenblau. Der TKT-Nährboden wurde später von SANDVIK und HAUGE (62) noch verbessert. HANSEN und OLSEN (31) fanden das TKT-Medium bei Bestandsmilchuntersuchung als gut geeignet.

In Deutschland haben sich besonders SEELEMANN und OBIGER (68) um die Anwendung und Verbreitung des CAMP-Testes und des TKT-Mediums bemüht. Das TKT-Medium hat sich jedoch trotz günstiger Ergebnisse nicht im gewünschten Maße durchgesetzt. Als Hauptgründe zitiert MÜLLER (54) die Aufwendigkeit und die relativ schwierige Herstellung.

MÜLLER (54) hat die Brauchbarkeit von Blutagarplatten und TKT-Medium zur Labordiagnose untersucht und verglichen. Es zeigte sich die Überlegenheit des TKT-Mediums, mit dem etwa 60 o/o mehr Stämme des Streptococcus agalactiae zur Diagnose kamen, als auf Blutplatten allein.

KRETZSCHMAR (46) schreibt über Nachteile des TKT-Nährbodens, die jeder selektive Hemmnährboden hat: Die gesuchten Streptokokken werden

im Wachstum durch die Hemmfarbstoffe in gewissem Maße gebremst, so daß einzelne Keime bei geringem Bakteriengehalt der Milch ebentuell nicht wachsen können. Da außer den Streptokokken auf dem TKT-Nährboden keine Mastitiserreger wachsen, ist dieser Nährboden nur als zusätzliches Medium anwendbar. Die Herstellung des Selektivnährbodens belastet im Routinebetrieb die Nährbodenküche erheblich. Ein weiterer Nachteil ist, daß man nicht erkennen kann, ob die Hämolyse auf dem TKT-Nährboden durch Eigenhämolyse oder CAMP-Hämolyse bedingt ist. Demgegenüber ist es der große Vorteil des TKT-Mediums, daß die sekundären Schmutzkeime im Wachstum fast völlig gehemmt werden, so daß auch bei stark verunreinigten Milchproben der kulturelle Galtnachweis gelingt.

BECHT (5) macht den Versuch, einen Nährboden zu finden, auf dem jeder Mastitiserreger wächst und auf dem gleichzeitig der Streptococcus agalactiae gut zu erkennen ist. Als gut eliminierend ermittelte er eine Toxin-Kongorot-Blutagarplatte, die diese Anforderungen weitgehend erfüllt. Sie ist außerdem noch bei Mischinfektionen und Schmutzkeimen brauchbar. Der Kongorot-Zusatz gestattet, die nach 24 Stunden Bebrütung gewachsenen Streptokokkenkolonien als Streptococcus agalactiae bzw. nicht zur Gruppe B gehörende Streptokokken zu diagnostizieren.

Ein Medium zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung.

Das zur selektiven Anreicherung von Streptokokken empfohlene Streptosel-Broth verwendete MITSCHERLICH (53). Dieses flüssige Nährmedium ist von den Baltimore Biological Laboratories entwickelt worden und hat folgende Zusammensetzung: (g pro Liter) Tryptikase 15,0; Phytone 5,0; Natr. Chlorid 4,0; Natr. Citrat 1,0; L-Cystine 0,2; Sulfit 0,2; Dextrose 5,0; Natr. Azid 0,2; Kristallviolett 0,000 02. Der Bodensatz von zentrifugierten Milchproben wurde mit 10 ml Streptosel-Broth überschichtet, 18 Stunden bebrütet und daraufhin auf TKT-Medium ausgespatelt. Durch dieses Verfahren konnten 91 o/o der mit Streptokokken infizierten Milchproben erfaßt werden im Vergleich zu 72 o/o ermittelter Streptokokkenstämme, welche aus dem gleichen Material ohne Anreicherung durch das TKT-Medium allein gefunden wurden.

TOLLE (77) berichtete in jüngster Zeit über die Entwicklung leistungsfähiger kulturellbakteriologischer Untersuchungsverfahren. Bei Verwendung von Streptosel-Broth wurde durch Zusatz eines Indikators versucht, das Wachstum von Streptokokken schon im Röhrchen selbst zu erkennen. Beim biochemischen Abbau des in Streptosel-Broth vorhandenen Reaktionskörpers Glukose, der von allen Streptokokken angegriffen wird, entsteht über die Milchsäurebildung eine pH-Verschiebung, die durch Umschlag des Indikators Bromkresolpurpur deutlich wird. Da ubiquitäre Sarcinen sich in Streptosel-Broth üppig entwickeln und ähnlich den Streptokokken durch Säurebildung einen Indikatorumschlag bewirken können, wurden antibiotische Stoffe geprüft, um das Wachstum von Sarcinen ausreichend zu hemmen, gleichzeitig aber das der Streptokokken nicht nachteilig zu beeinträchtigen. Als geeignet erwiesen sich Kanamycin und Fucidin. Diese Streptosel-Bromkresolpurpur-Kanamycin-Fucidin-Bouillon hat sich nach TOLLE (77) bei den bisherigen Untersuchungen bewährt. Mit dem TKT-Nährboden konnten aus 4909 Viertelgemelksproben 126 Sc.-agalactiae-Stämme (= 2,56 o/o) isoliert werden, während es nach selektiver Anreicherung 233 (= 4,74 o/o) B-Stämme waren, die ermittelt werden konnten. Setzt man die Gesamtzahl der Streptococcus-agalactiae-Stämme = 100 o/o, so waren bei der Bebrütung auf dem TKT-Medium nur 54,08 o/o dieser Stämme gefunden worden.

II. BAKTERIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSVERFAHREN FÜR STAPHYLOKOKKEN

Seit der Einführung der Antibiotika in die Mastitisbehandlung ist die milchhygienische und klinische Bedeutung der Staphylokokken erheblich angewachsen. Der immer höher werdende Anteil der Staphylokokken unter den Mastitiserregern wird in zunehmendem Maße schwieriger therapeutisch beeinflußbar. Da auch vielfach die Epidemiologie unklar ist, sucht man die Pathogenität und Bedeutung der Staphylokokken durch die Feststellung ihrer biologischen Eigenschaften mit Labormethoden zu klären.

Erschwerend für die Diagnose wirken sich die unterschiedlichen Klassifizierungssysteme für die Genera Staphylococcus und Micrococcus aus.

1. Biochemische Differenzierung

Zur Beurteilung der Pathogenität von Staphylokokken wurden viele biochemische Fähigkeiten untersucht: Pigmentbildung, Hämolysierungsvermögen, Mannitvergärung, Phosphataseferment, Hyaluronidasebildungsvermögen, Plasmaagglutination und Plasmakoagulation. Nach der Fähigkeit der Pigmentbildung, die eine Differenzierung von apathogenen und pathogenen Staphylokokken nicht erlaubt, gewannen bald die Hämolyseeigenschaften an Bedeutung. GLENNY und STEVENS (30) konnten bereits α - und ß-Toxin durch die Verwendung von Schaf- und Kaninchenerythrozyten unterscheiden. CRUICKSHANK (15) fand das Enzym Koagulase bei pathogenen Micrococcaceae, und es erwies sich als das bisher sicherste Pathogenitätskriterium. Fast alle weiteren biochemischen Differenzierungsversuche wurden in Beziehung zum Koagulasebildungsvermögen gesetzt. Einen Vergleich zwischen Hämolysin- und Koagulasebildung brachten ELEK und LEVY (24). Auch nach ihrer Meinung steht die Koagulasebildung in absoluter Übereinstimmung mit der Pathogenität. Koagulasepositive, unter denen oft ein hohe Prozentsatz Hämolyse produziert, besitzen weder α, ß- noch δ Lysin, sondern bewirken die Hämolyse durch ein viertes Lysin. Es wurde als -Lysin bezeichnet. Diese Beobachtung machte auch SCHALM (64), der bei apathogenen Micrococcaceae aus Milch häufig eine schmale Hämolysezone um die Kolonien fand, die mit der α-Hämolyse ver-

wechselt werden kann. ALBO-ELNAGA und KANDLER (1) stellten fest, daß zwischen der Koagulasereaktion und der Bildung der Hämolysine eine sehr enge Korrelation besteht, während der Zusammenhang mit den anderen geprüften biochemischen Merkmalen wesentlich geringer ist (Urease, Fibrinolyse, Kaseolyse, Eigelbreaktion, Gelatineverflüssigung, Pigmentbildungsvermögen). Alle koagulasepositiven Stämme wiesen α-, ß- und δ-Hämolysin einzeln oder in den verschiedenen Kombinationen auf. Wie ELEK und LEVY (24) fanden sie alle 7 Kombinationen der 3 Hämolysine. Koagulasenegative Stämme bildeten entweder kein Hämolysin (etwa 50 o/o), oder nur ε-Hämolysin. Ebenso fanden SCHALM und WOOD (66) unter 2084 Staphylokokken, die α-ß-Toxin oder ß-Toxin allein produzierten, weniger als 1 o/o Koagulasenegative. Außer der ß-Hämolyse läßt keine andere auf Rinderblutagar zu diagnostizierende Hämolyse eine Aussage über den Ausfall der Koagulasereaktion zu. Für die Überprüfung der Pathogenität von schwach- bzw. anhämolytischen Stämmen empfiehlt GEDEK (29) die Anwendung der Plasmaagglutination statt der Koagulasereaktion, da eine gute Übereinstimmung besteht und die Plasmaagglutination leichter durchzuführen ist. Bei stark hämolytischen Stämmen ist aber die Übereinstimmung zwischen Plasmaagglutination und Koagulasereaktion ungenügend, deshalb sollte die Pathogenität mit dem Röhrchentest überprüft werden. KAFFKA (41) konnte die Gelatineverflüssigung und die Mannitvergärung für eine eindeutige Pathogenitätsbestimmung nicht verwerten. Für die Routinediagnostik gut geeignete Methoden sind die Prüfung auf das Vorhandensein von Hyaluronidase, Fibrinolysin und Phosphatase. Der Hyaluronidasenachweis ist im Wert dem Koagulasetest gleichzusetzen. FEILS (26) schreibt über den Wert der Mannitreaktion, daß alle pathogenen Staphylokokken Mannit fermentieren, jedoch viele Saprophytische ebenso. Er empfiehlt zur orientierenden Unterscheidung pathogener von apathogenen Stämmen die Plasmaaglutination, verweist aber auf die wesentlich sicherere Differenzierung mit dem Koagulasetest. KUHLMANN (47) verglich 5 Testmethoden: Farbstoffbildung, Hämolysinbildung, Gelatineverflüssigung, Mannitvergärung und Plasmakoagulation. Von diesen 5 Eigenschaften ist die Plasmakoagulation das sicherste Kennzeichen pathogener Staphylokokken. Die Durchführung dieser Reaktion beansprucht aber viel Zeit. Der Nachweis der Gelatineverflüssigung stellt die unsicherste Testmethode dar, dauert mehrere Tage und ist deshalb für Routineuntersuchungen nicht geeignet. Gleich unsicher ist die Beurteilung der Hämolyse bei apathogenen Stämmen. Die Pigmentbildung liefert keine sicheren Anhaltspunkte für die Pathogenität.

Die Prüfung auf Mannitfermentation lieferte bei Apathogenen eindeutige Ergebnisse, da aber die Beurteilung dieser Probe erst am 3. Tage endgültig geschehen kann, sinkt ihre Bedeutung für die Schnelldiagnose erheblich. Dagegen ist die Prüfung auf das Vorkommen von Plasmakoagulase und Hyaluronidase innerhalb 20 Stunden abgeschlossen. Der Hyaluronidasetest ist dem Koagulasetest völlig gleichwertig. Der Phosphotasetest ist in seinem Wert der Mannitfermentation gleichzusetzen. Der negative Ausfall spricht stets für das Vorliegen einer apathogenen Art. Unter den Phosphotasepositiven sind aber häufig koagulasenegative Arten zu finden, deshalb kann die Reaktion als Differenzierungstest nur in Verbindung mit einem anderen Text durchgeführt werden. KUHLMANN (47) schlägt auf Grund seiner Untersuchungen zur Erkennung pathogener Staphylokokken vor, den Hyaluronidasetest und den Phosphotasetest heranzuziehen. Nach den Untersuchungen von FINK (28) sind aber beim Hyaluronidasetest unter den Hyaluronidasepositiven Koagulasenegative enthalten, ebenso wie bei der positiven Phosphotasereaktion. Er empfiehlt in erster Linie den positiven Ausfall der Plasmakoagulation zur Kennzeichnung der Pathogenität. RENK (61) nennt als wichtigstes Kriterium für die Pathogenität der Staphylokokken die Hämolysinbildung und die Fähigkeit Zitratblut zu koagulieren. Auf Grund biochemischer Merkmale klassifizierte BAIRD-PARKER (2) Mikrokokken und Staphylokokken in ausführlicher Arbeit. TERPLAN und GEDEK (74) beurteilten das Hämolysevermögen von Micrococcaceae und setzten es in Beziehung zur Koagulasereaktion. Außer der bei Staphylococcus aureus beobachteten $\alpha\beta$-Hämolyse wurden zwei weitere atypische Hämolyseformen je nach Intensität und Größe des Hämolysehofes registriert. Bei der Überprüfung mit dem Koagulasetest zeigte sich, daß alle koagulasepositiven Stämme auch $\alpha\beta$-hämolytisch waren. Dies konnte nach Meinung der Untersucher durch die Verwendung gewaschener Erythrozyten erreicht werden. Die Feststellung von $\alpha\beta$-Hämolyse mit gewaschenen Erythrozyten ist also gleichzeitig ein sicherer Hinweis auf das Vorhandensein von Koagulase. Die ß-Hämolyse, ob in Verbindung mit der α-Hämolyse, wie es meistens der Fall ist, oder nicht, stimmt nach GEDEK (29) absolut mit der positiven Koagulasereaktion überein. HEESCHEN und MEYER (31) untersuchten biologische Merkmale von aus Milch euterkranker und gesunder Kühe isolierten Micrococcaceae: Die Aufstellung der Pathogenitätskriterien gibt nur Hinweise in der Form, daß Stämme ,die Koagulase, Phosphotase, Hyaluronidase und Mannitvergärung zeigen, häufiger als Mastitiserreger zu finden sind als Stämme der Gattung Micro-

coccus. Der Anteil der Mastitiserreger ist in der Staphylococcus aureus-Gruppe (koagulasepositiv) höher als in der Staphylococcus epidermidis (koagulasenegativ) und hier wiederum höher als in der Micrococcus-Gruppe (koagulasenegativ; glukoseaerob).

Die Phagentypisierung hat für die Differenzierung der Micrococcaceae geringe Bedeutung erlangt, da die Lysotypie nur auf koagulasepositive Staphylokokken anzuwenden ist. Nach übereinstimmender Erfahrung verschiedener Autoren scheint für die Entstehung von Rindermastitiden kein einheitlicher Phagentyp verantwortlich zu sein. Allerdings ist nach HOFFMANN (37) der Typ 42 D der Lysisgruppe IV häufig anzutreffen.

2. Kulturelle Untersuchungsmethoden

Für die Anzüchtung und Identifizierung von Micrococcaceae aus Milchproben ist im Routinebetrieb die Blutplatte immer noch das Mittel der Wahl. Jedoch sollte nach SCHALM (64) ein Nährboden verwendet werden, der gewaschene Erythrozyten enthält. Wie auch die Untersuchungen von GEDEK (29) zeigten, ist die Ausbildung der $\alpha\beta$-Hämolyse auf Rinderblutagar offensichtlich abhängig von der Präparation des verwendeten Blutes. Die Verwendung von Schüttelblut ohne Waschen der Erythrozyten kann die Ausbildung der ß-Hämolyse erheblich hemmen. Außer Hämolyse- und Pigmentbildung kann die Blutplatte aber keine Hinweise auf die Pathogenität bringen. So kam es zur Entwicklung verschiedener Nährböden, die vor allem auf dem Pathogenitätskriterium Plasmakoagulation basieren.

KLASTRUP (43) entwickelte ein festes Substrat, auf dem die Eigenschaft der Staphylokokken, Koagulase zu produzieren, direkt abzulesen ist. Das Medium hat folgende Zusammensetzung: 40 o/o Kälberoxalatplasma, 1 o/o Menschenoxalatplasma, 2 - 3 o/o Agarbasis, pH 7,4. Die ausgestrichenen Proben werden 24 Stunden bebrütet und darauf 24 Stunden im Kühlschrank belassen. Positive Reaktionen kennzeichnen sich durch die Bildung opaker Zonen wechselnden Umfangs rings um die Kolonien. KLASTRUP untersuchte 441 koagulasenegative und 434 koagulasepositive Stämme. Der Koagulaseröhrchentest brachte dasselbe Ergebnis. HØGH (35) untersuchte koagulasepositive, $\alpha\beta$-hämolytische Staphylokokken mit einem Kristallviolettagar in der Art nach KLASTRUP (43). Bei Wachstum auf Kristallviolettagar

1 : 300 000 zeigen koagulasepositive Staphylokokkenkolonien ein charakteristisches Aussehen, indem sich das von den Staphylokokken gebildete Pigment mehr oder weniger mit dem Kristallviolett des Nährbodens verbindet. Er teilte die Ergebnisse in fünf verschiedene Kristallviolettgruppen ein. Vorzuziehen ist jedoch die Einteilung der Staphylokokken in 3 Kristallviolettgruppen wie es CHAPMAN und BEHRENS (9) vorschlugen, nämlich orange, violette und weiße Kolonien. HØGH (35) fand durch diesen Nährboden auch Zusammenhänge zwischen Penicillinresistenz und violetten Kolonien. DENEKE und BLOBEL (17) entwickelten Fibrinogen-Medien zur Diagnose von koagulasepositiven Staphylokokken. Man gießt Kaninchenplasma oder Rinderfibrinogenlösung auf die Oberfläche von festen Agarmedien, z. B. auf die Blutplatte. Es können nach der Bebrütung Koagulasereaktionen beobachtet werden, die genau mit dem Röhrchentest übereinstimmen. Ein Agarmedium, das Fibrinogen enthält, zeigt, wenn durch koagulasepositive Staphylokokken das Fibrin aus dem Fibrinogen entsteht, undurchsichtige Zonen um die Kolonien. Der Zusatz einer Rinderfibrinogenlösung zu einem Selektivmedium für Staphylokokken erbringt eine noch spezifischere Untersuchungsmöglichkeit für die Koagulaseproduktivität einzelner Kolonien- Die früheren Fibrinogenmedien (DUTHIE und LORENZ (21), KLEMPERER und HAUGHTON (44), ESBER und FAULCONER (25), BLOBEL, BERMAN und SIMON (6)) brachten alle die Schwierigkeit mit sich, das Fibrinogen undenaturiert in die Nährböden zu mischen. Im Verlauf der Studien über die Koagulasereaktion in Agarmedien stellte sich heraus, daß Plasma oder Fibrinogenlösung, direkt auf die Oberfläche gebracht, ganz absorbiert werden und dieselben Resultate erbringen. Als gute selektive Fibrinogenmedien erwiesen sich der Tellurit-Glycineagar nach ZEBOVITZ, EVANS und NIVEN (80) und das Polymyxin-Medium nach FINEGOLD und SWEENEY (27).

Die selektiven Medien zur Diagnose von koagulasepositiven Staphylokokken haben die verschiedensten Zusammensetzungen. BAIRD-PARKER (3) entwickelte einen eigelbhaltigen Nähragar mit selektiven Eigenschaften. Er enthält Eigelb, Kaliumtellurit, Glykokoll und Natriumpyruvat. Dieser ETGP-Agar ist nach DAVIS und DAVIS (16) der einzige Tellurit-haltige Nährboden, der gute Resultate bringt. Bei BAIRD-PARKERS (3) Untersuchungen stimmten der Nachweis von Koagulase und die positiven Reaktionen auf dem ETGPA-Agar häufig nicht überein

Die Eigelbreaktion fanden DAVIS und DAVIS (16) diagnostisch nicht ausreichend. Die Beziehung zur Koagulasereaktion ist nicht groß und die Reaktion selbst kann nicht gut erkannt werden.

Bei Überprüfung des Tellurit-Glykokoll-Agars nach ZEBOVITZ, EVANS und NIVEN (80) fanden HOEPRICH, CROFT und WEST (36), daß er einige Arten koagulasepositiver Staphylokokken hemmt.

CARANTONIS und SPINK'S (8) salt-egg-agar brachte gute Resultate, wenn die Pigmentierung der Kolonien betrachtet wurde. Die Eigelbreaktion wurde nur von 73 o/o koagulasepositiven Stämmen erzeugt. Der Polymyxinagar nach FINEGOLD und SWEENEY (27) mit 500 I.E. Polymyxin pro ml war der beste und am einfachsten vorzubereitende Agar. Jedoch ließ dieser Polymyxinagar keine Unterscheidung der koagulasepositiven Staphylokokken von anderen auf der Platte gewachsenen Keimen zu. Ein Zusatz von 1 o/o Mannit und 0,004 o/o Bromkresolpurpur verbesserte den Nährboden in dieser Hinsicht beträchtlich. Es wuchsen koagulasepositive Staphylokokken, da sie Mannit schnell vergären, in hellgelben Kolonien, die gewöhnlich mit einer gelben Zone umgeben waren. Die noch auf diesem Agar manchmal wachsenden koagulasenegativen Staphylokokken zeigten sich als kleine weiße Kolonien. Der diagnostische Wert des von FINEGOLD und SWEENEY (27) entwickelten Polymyxin-Agars wird durch Zusatz von Bromkresolpurpur und Mannit wesentlich verbessert (DAVIS und DAVIS (16)).

Weitere Vorteile des Polymyxin-Mediums sind das schnell und maximale Wachstum von koagulasepositiven Staphylokokken innerhalb 24 Stunden, auch von kleinster Einsaat, in typischen Kolonien mit schneller Pigmentbildung. CHAPMAN (9, 10, 11) hat einige selektiv wirkende Medien zur Anzüchtung und zur Differenzierung von koagulasepositiven und -negativen Staphylokokken entwickelt. Die selektive Wirkung dieser Medien basierte auf einem hohen Gehalt an NaCl und der Benützung von Mannit als Energiequelle. Die Differenzierung war durch die Säureproduktion aus Mannit und die Gelatinehydrolyse der koagulasepositiven Staphylokokken ermöglicht. Da jedoch auch einige koagulasenegative Staphylokokken diese Fähigkeit aufweisen, mußte auch immer wieder der Koagulasetest eingesetzt werden. Ein besser selektiv wirkendes Medium wurde von LUDLAM (51) vorgeschlagen. Dieses Medium enthält Tellurit und Lithiumchlorid als selektive Agentien und hat einen pH-Wert von 9,6. CHAPMAN (13) und MC DIVITT und

HUSSEMANN (20) fanden jedoch, daß LUDLAM'S Medium einen gewissen Teil der koagulasepositiven Stämme vom Wachstum abhielt.

ZEBOVITZ, EVANS und NIVEN (80) entwickelten ein Selektivmedium für koagulasepositive Staphylokokken, das sie von LUDLAMS Medium ableiteten. Dieser Agar nach ZEBOVITZ, auch Tellurit-Glykokollagar genannt, enthält: Trypton 1,0 o/o, Hefeextrakt 0,5 o/o, Mannit 0,5 o/o, K_2HPO_4 0,5 o/o, Lithiumchlorid 0,5 o/o, Glykokoll 1,0 o/o, Agar 2,0 o/o, Kaliumtellurit 0,02 o/o. Koagulasepositive Staphylokokken wachsen auf diesem Medium in schwarzen Kolonien. Nach längerer Bebrütung wachsen aber auch koagulasenegative Staphylokokken in ähnlich schwarzen Kolonien. Im Vergleich dieses Tellurit-Glykokollnährbodens (TG) zum Chapman-Stone-Agar und zum Phenolrotmannitsalt (PRMS)agar zeigte der TG-Agar deutliche Vorzüge. Als nachteilig erwies sich jedoch die teilweise Wachstumsbehinderung von Koagulasepositiven und sein Unvermögen bei längerer Bebrütung Koagulasenegative zu hemmen.

SKORKOVSKY (69) empfiehlt zur Isolierung von Staphylokokken einen Selektivnährboden mit einem Zusatz von Kaliumrhodanid. Zur Bewertung der Pathogenität einer auf dem Nährboden gewachsenen Staphylokokkenkolonie wählte er die Bestimmung ihrer Fähigkeit Mannit zu spalten.

SZEREMI (73) fand einen Nährboden zur schnelleren Diagnose von pathogenen Staphylokokken, der als selektives Agens Quecksilberchlorid enthält und als Grundlage den zur Phosphatasereaktion geeigneten Nährboden nach BARBER und KUPER (4) hat.

TOLLE (77) hat bei der Entwicklung eines Selektiv- und Anreicherungsmediums für koagulasepositive Staphylokokken verschiedene selektive Medien untersucht. Das in Deutschland weitverbreitete Selektivmedium nach CHAPMAN (PRMS) eignete sich weder in flüssiger noch in fester Form. Auch der Polymyxinnährboden von FINEGOLD und SWEENEY hatte nach den Untersuchungen von TOLLE nicht die selektiven Eigenschaften. Erst eine Modifikation des von ZEBOVITZ angegebenen Nährbodens brachte die erwünschten Ergebnisse.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Für die bakteriologische Diagnose von chronischen Eutererkrankungen gibt es an sich bereits eine Fülle von Möglichkeiten. Leider haften ihnen im einzelnen bei der praktischen Durchführung Mängel an. Bei den einen muß die Herstellung der Nährmedien als kompliziert und aufwendig angesehen werden, bei anderen aber läßt die diagnostische Sicherheit Wünsche offen. Außerdem ist zumeist für die Beurteilung der kulturellen Ergebnisse sehr große Erfahrung notwendig. Von Vorteil wäre auch, die Ergebnisse in wesentlich kürzerer Zeit zu erhalten. Deshalb ist es von besonderem Interesse, daß TOLLE (77) zwei Medien empfahl, die nach seinen Angaben die Forderungen der Routinediagnostik erfüllen, d.h. obigen Unzulänglichkeiten weitgehendst abhelfen sollen. Dies gab Anlaß, die Ergebnisse von Blutplatte und Edwards Medium mit denen der von TOLLE (77) empfohlenen Medien zu vergleichen.

1. Material und Methode

Im Zeitraum von August 1966 bis März 1967 wurden 3048 Viertelgemelksproben nach der Methode von DIERNHOFER (19) entnommen. Die Feststellung des Zellgehaltes der Milch erfolgte mit dem Schalm-Mastitistest.

Die Viertelgemelksproben wurden mit normierter Platinöse (0,01 ml) zuerst auf die Blutplatte ausgestrichen. Diese Blutplatte hat als Grundsubstanz die dehydrierte Bacto Tryptose Blood Agar Base (Difco) mit folgender Zusammensetzung:

Bacto-Tryptose	10 g
Bacto-Beef-Extrakt	3 g
Natrium-Chlorid	5 g
Bacto-Agar	15 g

Bei der Herstellung der Blutplatte werden 33 g dieser Bacto Tryptose Blood Agar Base und 1 g Äskulin in 1000 ml destilliertem Wasser durch Erhitzen im Dampftopf vollständig aufgelöst. Nach Sterilisierung im Auto-

klaven (15 Minuten bei 121° C und 1,2 atü Druck) wird das Nährmedium auf 45 - 50° C abgekühlt, so daß es gerade noch flüssig ist. Daraufhin werden 5 o/o 3 - 5mal gewaschene Rindererythrozyten hinzugegeben und mit dem Medium gründlich vermischt. Der nun vollständige Nährboden wird in sterile Petrischalen gegossen. Es werden je 4 Viertelgemelksproben mit einer jeweils ausgeglühten Platinöse auf die Blutplatte ausgestrichen. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C werden die Blutplatten abgelesen. Die Streptokokkenkolonien zeigen sich als kleine, glatte, glänzende Kolonien, die durch verschiedene Hämolyseformen unterschieden werden können. Bei der Alpha-Hämolyse kann man schmale, aufgehellte Ringe um die Kolonien erkennen. Als Beta-Hämolyse wird eine besonders kräftige und breite Ringzonenbildung bezeichnet. Unter Gamma-Hämolyse versteht man eine Wuchsform, bei der die Blutkörperchen um die Kolonien unverändert sind und der Blutfarbstoff nicht angegriffen wird. Durch den Zusatz von Äskulin entsteht beim Wachstum von Streptococcus uberis und Enterokokken eine leichte Braunfärbung um die Kolonien. Neben den verschiedenen Streptokokkenkolonien wurden die Kolonien der Micrococcaceae differenziert, wobei das Hämolysierungsvermögen als wichtigstes Merkmal festgehalten wurde. Es wurden unterschieden: Kolonien ohne Hämolysebildung, Kolonien mit nach Durchmesser unterschiedlichen α -Hämolysezonen und Kolonien mit α - und ß-Hämolyse und ß-Hämolyse allein. Außerdem werden die Milchproben 24 Stunden bei 37° C bebrütet und dann auf das Edwards-Medium gebracht. Die Zusammensetzung dieses Nährbodens ist wie die der Blutplatte, nur werden auf 100 ml Agar 0,13 ml einer 0,1 o/oigen Kristallviolettlösung und 3,33 ml einer 1 o/oigen Thalliumsulfatlösung zugefügt. Die Herstellung der Edwardsplatten geschieht wie die der Blutplatte. Die Beurteilung des Wachstums von Streptokokkenkolonien erfolgt nach 24 Stunden wie auf der Blutplatte.

Parallel zur Blutplatte wurden die zwei neuen Medien nach TOLLE (77) eingesetzt, die eine Anreicherung und eine selektive Anzüchtung von Streptokokken bzw. koagulasepositiven Staphylokokken bewirken sollen.

a) Das Medium zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung von Mastitis-Streptokokken.

   Zusammensetzung des Grundnährbodens: (Streptosel Broth der Baltimore Biological Laboratories)

	Gramm je Liter
Trypticase	15,0
Phyton	5,0
Natriumchlorid	4,0
Natriumcitrat	1,0
l-Cystin	0,2
Natriumsulfit	0,2
Glukose	5,0
Natriumazid	0,2
Kirstallviolett	0,0002
pH	7,4

Herstellung des gebrauchsfertigen Nährbodens:

Als Indikator wird dem Nährboden Bromkresolpurpur (20 ml je Liter einer Lösung von 0,1 g Bromkresolpurpur; 18,5 ml $^{n}/_{100}$ NaOH ad 250 ml Aqua dest.) zugefügt. Die Streptosel-Bromkresolpurpur-Bouillon wird 15 Minuten bei 118° C autoklaviert. Zur Hemmung der in Streptosel-Broth üppig wachsenden Sarcinen werden dem sterilisierten Nährboden Kanamycin in einer Menge von 1/1000 mg = 1 Gamma je ml und Fucidin in einer Menge von 1/10000 = 0,1 Gamma je ml zugesetzt. Kanamycin und Fucidin hemmen das Wachstum von Sarcinen fast vollständig, während Mastitis-Streptokokken weitgehend unbeeinflußt bleiben.

Das sterile Abfüllen des Nährbodens in Röhrchen geschieht mit einer ausgekochten automatischen Pipettierspritze. Es werden je 5 ml steril in zuvor keimfrei gemachte Röhrchen abgefüllt.

Aus den gründlich durchmischten Milchproben werden 0,25 ml Milch in das Nährbodenröhrchen pipettiert. Nach dem Beimpfen erfolgt eine gründliche Durchmischung von Milch und Nährboden. Die Bebrütung erfolgt bei 37° C, 20 - 24 Stunden.

Beurteilung der bebrüteten Nährböden:

Eine durch Wachstum von Streptokokken bedingte Vergärung der Glukose bzw. Laktose bewirkt einen Umschlag des Indikators von Purpur nach gelb.

b) Das Medium zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung koagulasepositiver Staphylokokken.

Zusammensetzung des Grundnährbodens:

	Gramm je Liter
Sojapepton	3,5
Trypton	10,0
Hefeextrakt	6,5
d-Mannit	5,0
Glykokoll	10,0
Di-Kaliumphosphat	5,0
Lithiumchlorid	5,0
Natriumpyruvat	10,0

Der Nährboden wird durch Autoklavieren (15 Minuten bei 121° C) sterilisiert. Einem Liter des abgekühlen Nährbodens werden 5,7 ml einer 3,5 o/oigen Kalium-Tellurit-Lösung zugefügt. Die Einsaatmenge der der zu untersuchenden Milchprobe beträgt 0,1 ml. Die Bebrütung erfolgt bei 37° C, mindestens 24 Stunden, höchstens 36 Stunden.

Beurteilung des bebrüteten Nährbodens:

Eine deutliche Schwarzfärbung des Nährbodens spricht mit hoher Sicherheit dafür, daß koagulasepositive Staphylokokken gewachsen sind. Auch ein deutlicher schwarzer Bodensatz bei unveränderter überstehender Flüssigkeit wird als positives Ergebnis gewertet. Nährbodenröhrchen mit geringer Graufärbung oder angedeutetem schwarzen Bodensatz können in Einzelfällen wenige pathogene Staphylokokken enthalten.

2. Ergebnisse

Bei der bakteriologischen Untersuchung der 3048 Viertelgemelksproben ergaben sich mit den beschriebenen Methoden folgende Befunde:

a) Streptokokken

Mittels der Blutplatte konnten 205 Streptokokkenstämme isoliert werden. Während 179 dieser Stämme auch auf der Edwardsplatte als Streptokokken zu diagnostizieren waren, konnten 26 Stämme, die auf der Blutplatte als Streptokokken angesprochen wurden, auf der Edwardsplatte nicht weiter verfolgt werden. 192 der auf der Blutplatte gefundenen 205 Stämme wuchsen gleichzeitig in Streptosel-Broth nach TOLLE (Abb. 1).

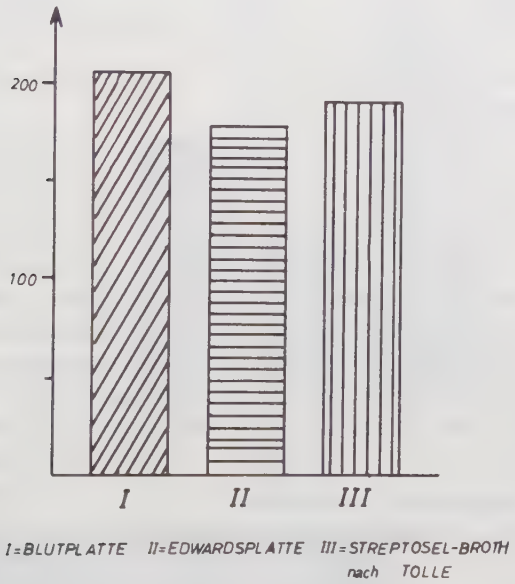

Abb. 1: Nachweis der auf Blutplatte gefundenen Streptokokkenstämme auf Edwardsplatte und in Streptosel-Broth.

Auf der Edwardsplatte, auf welche die 20 - 24 Stunden bebrüteten Milchproben ausgestrichen worden waren, fanden sich 394 Streptokokkenstämme. Davon erschienen gleichzeitig 179 Stämme auf der Blutplatte, 260 dieser Stämme wuchsen in Streptosel-Broth. (Abb. 2)

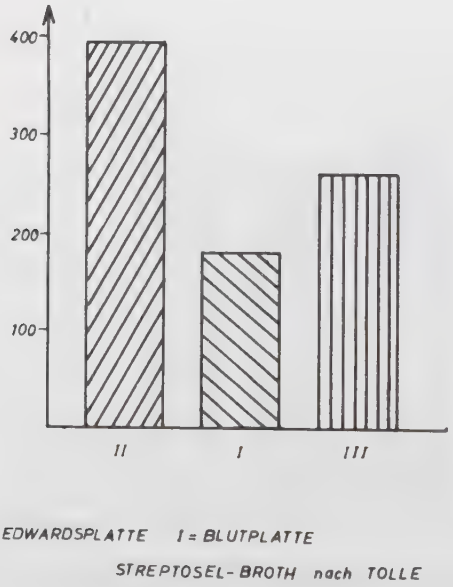

Abb. 2: Nachweis der auf Edwardsplatte gefundenen Streptokokkenstämme auf Blutplatte und in Streptosel-Broth.

Bei dem an der Klinik routinemäßig durchgeführtem Untersuchungsverfahren (Ausstreichen der Proben auf Blutplatten und Ausstreichen der bebrüteten Milchproben auf Edwardsplatten) wurden insgesamt 420 Streptokokkenstämme nachgewiesen. Davon wurden 277 Stämme (= 65 o/o) auch in Streptosel-Broth festgestellt. Weitere 60 Stämme, die in Streptosel-Broth gefunden wurden, konnten dagegen nicht durch Blut- oder Edwardsplatten ermittelt werden. (Tab. 1)

auf Blutplatte	205,	davon	192	gleichzeitig in
auf Edwardsplatte	394,	"	260	Streptosel-
auf Blut- oder Edwardsplatte	420,	"	277	Broth
in Streptosel-Broth	337,	"	277	gleichzeitig auf Platten

Tab. 1: Nachweis der Streptokokkenstämme aus 3048 Viertelgemelksproben.

Bei Zusammenfassung der Ergebnisse nach der Plattenmethode und mit Streptosel-Broth ergibt sich, daß in insgesamt 480 Proben Streptokokken mit einer oder mit beiden Methoden nachzuweisen waren. Davon fanden sich 277 Stämme sowohl auf den Platten als auch in Streptosel-Broth, 143 Stämme wurden nur auf den Platten, nicht aber in Streptosel-Broth gefunden und 60 Stämme konnten in Streptosel-Broth, nicht aber auf den Platten diagnostiziert werden. (Abb. 3)

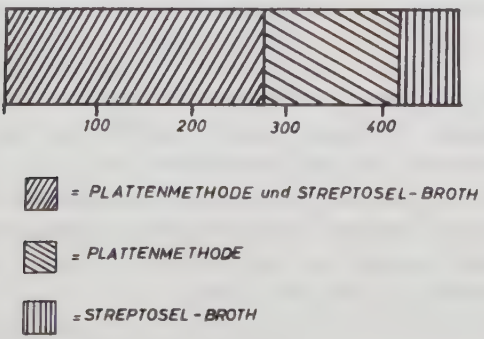

Abb. 3: Nachweis von 480 Streptokokkenstämmen mittels Plattenmethode und Streptosel-Broth.

Setzt man die insgesamt ermittelte Zahl von 480 Stämmen gleich 100 o/o, so zeigt sich, daß mit Blut- und Edwardsplatte 87,5 o/o, mit Streptosel-Broth 70,2 o/o aller Stämme aufgedeckt wurden. (Abb. 4)

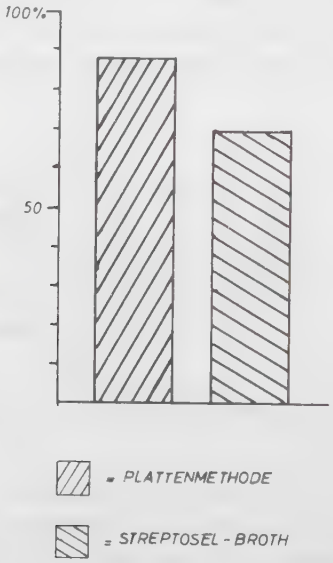

Abb. 4: Prozentualer Anteil der ermittelten Streptokokkenstämme durch Plattenmethode und Streptosel-Broth.

In einem weiteren Arbeitsgang wurden die 143 Stämme, die nur auf den Platten, sowie die 60 Stämme, die nur in Streptosel-Broth nachzuweisen waren, näher überprüft.

Abstriche von den Plattenkolonien wurden mit einer Öse direkt in Streptosel-Broth gebracht und bebrütet. Dabei zeigte sich, daß 80 von 143 Stämmen doch Glukose vergären konnten und den Indikatorumschlag nach gelb bewirkten. Bei einigen Stämmen war der Farbumschlag im Röhrchen erst nach 2 - 3-tägiger Bebrütung zu erkennen. Die restlichen 63 Stämme vermochten die Glukose der Bouillon nicht zu vergären, waren also in Streptosel-Broth nicht als Streptokokken zu diagnostizieren.

Bei der umgekehrten Nachprüfung der 60 Streptokokkenstämme, die nur in Streptosel-Broth, zunächst aber nicht auf den Platten nachzuweisen waren, zeigte sich beim Ausstreichen einer Probe aus der bebrüteten Bouillon auf Edwardsplatten, daß in allen Fällen Streptokokkenkolonien zu finden waren.

b) Staphylokokken

Bei den Untersuchungen zur Routinediagnostik für Angehörige der Familie der Micrococcaceae waren aus den 3048 Viertelgemelksproben mit der Blutplatte 756 Stämme zu diagnostizieren. Die Unterscheidung der Genera Staphylococcus und Micrococcus auf der Blutplatte wurde nach dem Vorhandensein der ß-Hämolyse (hot-cold-lysis) durchgeführt. Stämme, die eine $\alpha\beta$- oder ß-Hämolyse auf der Blutplatte bewirkten, wurden als Staphylokokken bezeichnet. Stämme ohne ß-Hämolyse wurden nach der Größe ihrer α-Hämolysezone als Micrococcus (M^{2-3}, M^2, M^{1-2}, M^1 und M) eingeordnet. Aufgeteilt nach dem Hämolysierungsvermögen waren unter den 756 Stämmen 169 Staphylokokken ($\alpha\beta$ Sta) und 587 Mikrokokken, davon 13 M^{2-3}, 34 M^2, 62 M^{1-2}, 478 M^1 und M.

Der Bouillon zur selektiven Anzüchtung und Anreicherung liegen andere Beurteilungskriterien zu Grunde: Es wachsen darin durch die selektive Wirkung nur koagulasepositive Staphylokokken. Auffallend war aber das verschiedene Wachstum in den Röhrchen. Dementsprechend wurde unterschieden zwischen Röhrchen, in denen sich das Wachstum von Staphylokokken zeigte, durch schwarzen Bodensatz und graue Trübung in der Bouillon (B+T), durch schwarzen Bodensatz ohne Trübung der darüberstehenden Bouillon (B), durch mehr oder weniger starke Anhäufung von schwarzen, stecknadelkopfgroßen Punkten (++) oder durch einen schwarzen Punkt unter Stecknadelkopfgröße (+).

Auf der Blutplatte		In der Selektiv- und Anreicherungsbouillon B+T	B	++	+	-
$\alpha\beta$ Sta	169	123	17	19	6	4
M^{2-3}	13	8	2	2	1	-
M^{2}	34	18	5	5	4	2
M^{1-2}	62	14	9	9	20	10
M^{1} u M	478	32	20	53	186	187
-		11	16	29	167	
	756	206	69	117	384	
			275			
		koagulase-positive				

Tab. 2: Zusammenstellung und Vergleich der Ergebnisse von Blutplatte und Selektiv- und Anreicherungsbouillon.

Von den 169 auf der Blutplatte als $\alpha\beta$-hämolytisch diagnostizierten Staphylokokken wuchsen 123 mit B T, 17 mit B, 19 mit ++, 6 mit +; bei 4 $\alpha\beta$ Sta der Blutplatte fehlte eine gleichzeitige Reaktion in der Anreicherungsbouillon. (Tab. 2)

140 der 169 $\alpha\beta$-hämolytischen Staphylokokkenstämme (= 82,8 o/o) erwiesen sich demnach als koagulasepositiv in der Bouillon. Umgekehrt fanden sich unter den 275 Stämmen, die nach der Reaktion in der Bouillon als koagulasepositiv anzusprechen waren, nur 140 (= 50,9 o/o), die auf der Platte auch $\alpha\beta$-Hämolyse zeigten; bei 33 Stämmen war die α-Hämolyse stark ausgeprägt (M^{2-3} und M^{2}).

Von den 587 auf der Blutplatte als Mikrokokken diagnostizierten Stämmen wuchsen in der Bouillon 108 mit Bodensatz (mit oder ohne Trübung), 280 mit schwarzen Punkten in der Röhrchenkuppe, während 198 keine Verän-

derungen in der Bouillon bewirkten. Andererseits waren 27 mal Bodensatz und 196 mal schwarze Punkte in der Bouillon aufgetreten, ohne daß in diesen Fällen Mikrokokken auf der Blutplatte nachzuweisen waren.

Der Vergleich der bakteriologischen Befunde in Korrelation zum Schalm-Mastitis-Test (SMT) brachte folgende Ergebnisse: in Bezug auf die Befunde der Blutplatte zeigte sich, daß 38 o/o der $\alpha\beta$-Staphylokokken mit der Schalmreaktion 1, 27,9 o/o mit 2; 18,3 o/o negativ reagierten. Von den M^{2-3} und M^2 (stark α-hämolytische Mikrokokken) verursachten 33,4 o/o eine Schalmreaktion 2, der Anteil der Schalmreaktion von schwach α-hämolytischen bis anhämolytischen Mikrokokken ließ den prozentualen Anteil von Schalmnegativen auf 38,7 bei M^{1-2} und 58,4 bei M und M^1 ansteigen.

Die bakteriologischen Befunde, die sich mittels der Anreicherungsbouillon für Staphylokokken ergaben, hatten ähnliche Beziehungen zum Schalmtest, wie die Befunde der Blutplatte. So wiesen die Micrococcaceae, die eine B T-Reaktion in dem Staphylokokken-Medium verursachten, zu 33,7 o/o eine Schalmreaktion von 1, 26,8 o/o von 2 auf, 25.9 o/o waren Schalmnegativ. Bei den Stämmen, die nur mit Bodensatz in der Bouillon wuchsen, stieg der Anteil der Schalmnegativen bereits auf 44,7 o/o und bei den im Staphylokokken-Medium schwach reagierenden Mikrokokken auf 55,2 o/o. (Tab. 3)

	Schalmreaktionen				
	-	$\frac{+}{-}$	1	2	3
$\alpha\beta$-Sta	18,3	10,4	38,0	27,9	5,4
M^{2-3}, M^2	30,8	5,2	23,0	33,4	7,6
M^{1-2}	38,7	16,2	33,9	11,2	0,0
M u. M^1	58,4	11,5	24,5	5,1	0,5
B + T	25,9	9,3	33,7	26,8	4,3
B	44,7	17,9	29,9	7,5	0,0
+ + und +	55,2	10,8	25,3	8,1	0,6

Tab. 3: Die Beziehungen der bakteriologischen Befunde des Staphylokokken-Mediums und der Blutplatte zum Schalm-Mastitis-Test.

D. DISKUSSION

Wie aus den Ergebnissen der zur Untersuchung auf Streptokokken verwendeten Methoden zu ersehen ist, erwiesen sich die Anreicherung der Proben durch Bebrütung der Milch und Ausstreichen auf das selektiv wirkende Edwardsmedium und die Anzüchtung in Streptosel-Broth als gleich wirksam.

Der gute Anreicherungseffekt von Streptosel-Broth zeigte sich darin, daß unter den 337 Streptokokkenstämmen 60 waren, die zunächst weder auf der Blutplatte, noch - nach Bebrütung der Milchproben - auf der Edwardsplatte gleichzeitig angezüchtet werden konnten. Alle diese Stämme erwiesen sich bei nochmaliger Überprüfung auch auf der Edwardsplatte als Streptokokken.

Andererseits aber wuchsen von den 394 Stämmen, die auf der Edwardsplatte ermittelt werden konnten, nur 260 gleichzeitig in Streptosel-Broth. Bei direktem Beimpfen der Bouillon mit Plattenkolonien von Stämmen, die zunächst nicht in Streptosel-Broth nachgewiesen werden konnten, war zu erkennen, daß diese Keime entweder in der Bouillon nicht angereichert worden waren (80 Stämme) oder aber ein zu schwaches Säurebildungsvermögen aufwiesen (63 Stämme). Es muß demnach damit gerechnet werden, daß sowohl mit der Plattenmethode als auch mit Streptosel-Broth ein gewisser Anteil an Streptokokken nicht erfaßt wird, wobei die durch eines der beiden Arbeitsverfahren nicht diagnostizierten Stämme nicht identisch sind.

Offensichtlich gelingt die Anzüchtung in einer Reihe von Fällen besser in der Bouillon, in anderen Fällen wiederum leichter auf dem Edwardsmedium nach Bebrütung der Milch. Die Keimzahl in der Milch und damit die Einsaatmenge in das Nährmedium sind hier entscheidend. Für die Routinediagnostik dürften diese Fehlergebnisse bei beiden Methoden kaum von Bedeutung sein.

Falsch positive Ergebnisse wurden mit Streptosel-Broth nicht festgestellt. Der selektive Zusatz von Kanamycin und Fucidin ist offensichtlich gut geeignet zur Unterdrückung des Wachstums von Sarcinen.

Die Beurteilung der bebrüteten Bouillon ist einfach und schnell auch durch ungeübtes Personal durchführbar. Die positiven Reaktionen sind in jedem Falle durch den Farbumschlag des Indikators eindeutig und auch bei großer Probenzahl mit einem Blick zu erfassen. Die Ergebnisse liegen 18 - 24 Stunden früher vor als die der Edwardsplatte nach Bebrütung der Milch.

Das Wachstum auf der Edwardsplatte liefert zweifellos bessere Informationen zur Identifizierung und Differenzierung von Streptokokken, insbesondere durch den Zusatz von Aeskulin und Einschaltung des CAMP-Testes. Im Bedarfsfall können jedoch ohne Zeitverlust aus der Bouillon Platten beimpft oder Differenzierungen mit dem CAMP-Test vorgenommen werden.

Als Nachteil der Anreicherung in Streptosel-Broth kann gewertet werden, daß Streptokokken mit schwachem Säurebildungsvermögen in der Bouillon nicht erkannt werden. Da alle im Kuheuter nachzuweisenden Streptokokken Ursache einer Mastitis sein können, diese Streptokokken aber ein unterschiedlich starkes Säurebildungsvermögen aufweisen, wird die Diagnostik mit Streptosel-Broth in ihren Möglichkeiten eingeschränkt. In der Galtdiagnostik allerdings bleibt dieser Umstand ohne Belang, da Streptococcus agalactiae stets starke Säurebildung aus Glukose zeigt.

Bezüglich des Arbeits- und Zeitaufwandes ist festzustellen, daß die Vorbereitung der Bouillon-Röhrchen einfacher und schneller zu erledigen ist als die Zubereitung der festen Nährböden und das Gießen der Platten. Dieser Vorteil wird jedoch weitgehend wieder aufgehoben durch den erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand, der durch das Beimpfen der Bouillon mittels Pipetten sowie der Reinigung und Sterilisierung der Glaswaren entsteht.

Ein Vergleich der Methoden zur Erfassung euterpathogener Staphylokokken ist infolge der unterschiedlichen Pathogenitätskriterien, nach denen die Keime in der Bouillon und auf der Blutplatte beurteilt werden, nur indirekt möglich.

Das Pathogenitätskriterium, das auf der Blutplatte von vorrangiger Bedeutung ist und in den vorliegenden Untersuchungen ausschließlich festgehalten wurde, ist das Hämolysierungsvermögen. Es wurde unterschieden zwischen hot-cold-lysis (β-Hämolyse) und den verschiedengradigen α-Hämolyse-

formen. Allein die ß-hämolytischen Micrococcaceae wurden als Staphylokokken bezeichnet.

In der Bouillon dagegen werden selektiv koagulasepositive Staphylokokken angereichert, so daß den beiden Untersuchungsverfahren unterschiedliche Pathogenitätskriterien zu Grunde liegen. Da aber nach GEDEK (29) praktisch alle ß-hämolytischen Staphylokokken koagulasepositiv sind, dürfte ein Vergleich unter dieser Einschränkung statthaft sein.

In vorliegendem Untersuchungsmaterial erwiesen sich von 169 ß-hämolytischen Staphylokokkenstämmen 140 = 82,8 o/o nach den Beurteilungsrichtlinien von TOLLE als koagulasepositiv. Bei nochmaliger direkter Beimpfung der Bouillon mit den Plattenkolonien einiger der 29 ursprünglich koagulasenegativ erscheinenden Stämme erwiesen sich diese doch als koagulasepositiv bei intensivem Wachstum mit Bodensatz und Trübung. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, daß bei sehr geringem Keimgehalt die Anreicherung in der Bouillon möglicherweise nicht gelingt.

Umgekehrt wurden 27 mal in der Bouillon koagulasepositive Staphylokokken angezeigt, ohne daß sich in diesen Fällen auf der Blutplatte Micrococcaceae nachweisen ließen. Hier erwies sich die Anreicherungsbouillon als die überlegene Methode.

Insgesamt wurden aus den 3048 Viertelgemelksproben 275 mal eindeutig koagulasepositive Staphylokokken in der Bouillon nachgewiesen. Da von diesen 275 Stämmen nur 140 auf der Blutplatte ß-Hämolyse zeigten, finden sich die übrigen Stämme unter den α -hämolytischen Mikrokokken (mit Ausnahme der oben erwähnten 27 auf der Blutplatte nicht nachgewiesenen Stämme). Das würde bedeuten, daß sich auch unter den Micrococcaceae ohne ß-Hämolyse koagulasepositive Stämme befinden.

Tatsächlich hat GEDEK (29) in seinem Untersuchungsmaterial festgestellt, daß unter den stark α -hämolytischen Mikrokokken etwa 57 o/o koagulasepositiv, unter den schwach hämolytischen rund 18 o/o und unter den anhämolytischen etwa 4 o/o koagulasepositiv waren. Legt man die hier verwendeten Untersuchungsmethoden zu Grunde, so ergeben sich folgende Verhältnisse: Von 47 stark hämolytischen Stämmen (M^{2-3} und M^{2}) waren 33 = 70,2 o/o koagulasepositiv, von 62 schwach hämolytischen Stämmen

(M^{1-2}) waren 23 = 37,0 o/o koagulasepositiv und von 478 anhämolytischen Stämmen (M^1 und M) waren noch 52 = 10,8 o/o koagulasepositiv.

Hiermit läßt sich auch der zytologische Befund der Milchproben in Einklang bringen. Bezieht man den Gesundheitszustand des Euters, gemessen am Zellgehalt der Milch mit ein, so zeigt sich, daß die ß-hämolytischen Staphylokokken in 71,2 o/o der Fälle erhöhten Zellgehalt (Schalmtest-Reaktion 1, 2 und 3) verursachten. Bei den Mikrokokken mit starker α -Hämolyse liegt dieser Prozentsatz noch bei 63,9 o/o, während er bei den schwach hämolytischen auf 45,0 o/o und schließlich bei den anhämolytischen auf 30,0 o/o abfällt. (Tab. 3)

Die sich mit Bodensatz und Trübung der Bouillon anzeigenden koagulasepositiven Staphylokokken stammten zu 64,7 o/o aus Milchproben mit erhöhtem Zellgehalt. Dieser Anteil betrug bei den nur mit Bodensatz wachsenden Staphylokokken noch 37,2 o/o und bei den mit schwarzen Punkten wachsenden Mikrokokken 33,9 o/o.

Daraus ergibt sich, daß die ß-hämolytischen und stark α -hämolytischen Staphylokokken ebenso wie die mit Bodensatz und Trübung in der Bouillon wachsenden koagulasepositiven Staphylokokken eine deutlich erhöhte Euterpathogenität gegenüber den übrigen Micrococcaceae aufweisen. Die mit schwacher oder fehlender Hämolyse auf der Platte sowie nur mit Bodensatz oder einigen schwarzen Punkten in der Bouillon wachsenden Micrococcaceae waren demgegenüber zu einem weit geringeren Anteil mit Zellgehaltserhöhungen verbunden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 3048 Viertelgemelksproben auf Streptokokken und Staphylokokken untersucht.

1. Mittels der Blutplatte konnten 205 Streptokokkenstämme isoliert werden. 179 dieser Stämme waren auf dem Edwardsmedium, 192 in Streptosel-Broth gleichzeitig nachzuweisen.

2. Auf der Edwardsplatte waren 394 Streptokokkenstämme zu diagnostizieren. 260 dieser Stämme wuchsen in Streptosel-Broth.

3. Mit Streptosel-Broth konnten 337 Streptokokkenstämme aufgedeckt werden, davon wuchsen 277 gleichzeitig auf Platten.

Insgesamt waren in 480 Proben Streptokokken mit einer oder mit beiden Methoden nachgewiesen worden, 277 fanden sich sowohl auf Platten als auch in Streptosel-Broth, 143 Stämme konnten nur auf den Platten und 60 Stämme nur in Streptosel-Broth diagnostiziert werden. Mit Blut- und Edwardsplatte wurden demnach 87,5 o/o, mit Streptosel-Broth 70,2 o/o aller Stämme ermittelt.

Bei der Untersuchung auf Micrococcaceae waren

1. mit der Blutplatte 169 $\alpha\beta$-Staphylokokken und 587 Mikrokokken ermittelt worden.

2. Bei der Untersuchung der Proben mit der Anreicherungsbouillon nach TOLLE ergaben sich 776 verschiedene Veränderungen in den Röhrchen. 275 wurden von koagulasepositiven Stämmen hervorgerufen. Darunter waren 140, die auf der Blutplatte auch $\alpha\beta$ -Hämolyse zeigten. 27mal wurden in der Bouillon koagulasepositive Staphylokokken angezeigt, ohne daß sich in diesen Fällen auf der Blutplatte Micrococcaceae nachweisen ließen.

Der zytologische Befund der Milchproben zeigte, daß die ß-hämolytischen

und stark α'-hämolytischen Staphylokokken ebenso wie die mit Bodensatz und Trübung in der Bouillon wachsenden koagulasepositiven Staphylokokken eine deutlich erhöhte Euterpathogenität gegenüber den übrigen Micrococcaceae aufweisen.

Die Anreicherungsmedien für Streptokokken und koagulasepositive Staphylokokken nach TOLLE sind für die Routinediagnostik mit ausreichender Sicherheit verwendbar.

SUMMARY

3048 quarter milk samples were investigated for streptococci and staphylococci.

1. 205 strains of streptococci were isolated by means of a blood pate. 179 of these strains were on the Edwardsmedium and 192 streptosel-broth simultaneously identified.

2. On the Edwards-plate 394 strains of streptococci could be diagnostified. 260 of the strains grew in streptosel-broth.

3. 337 strains of streptococci were revealed by streptosel-broth, 260 which grew simultaneously on plates.

In a total of 480 samples streptococci were identified using either one or both methods. 277 were present on plates and in streptosel-broth as well, 143 strains could have been diagnostified only on plates and 60 strains only in streptosel-broth. Thus, 87,5 o/o of the total of strains were defined by means of blood- and Edwards-plates and 72 o/o in streptosel-broth.

During investigation of micrococcaceae:

1. 169 $\alpha\beta$ -staphylococci and 587 micrococci were defined using the blood plate.

2. Investigation of the samples with the enriching TOLLE's bouillon showed 776 various changes in the tubes. 275 were caused by coagulase-positive strains. On the blood plate, 140 of them showed also $\alpha\beta$ -haemolysis. 27 times in the bouillon there were found coagulase-positive staphylococci without micrococcaceae being traced in these cases on the blood plate.

The cytologic findings of the milk samples disclosed that the ß-haemolytic staphylococci and strongly α -haemolytic staphylococci as well as the

coagulase-positive staphylococci growing in the bouillon with sediment and turbidity show a clearly increased pathogenisy of the udder as compared with the other micrococcaceae.

The enriching TOLLE's media for streptococci and coagulasepositive staphylococci are applicable with sufficient certainty for the routine diagnosis.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Albo-Elnaga, I.G. und Kandler, O.
   Zur Charakterisierung der in Milch verbreiteten Staphylokokken.
   Zbl. f. Bkt., I. Orig. 196, 438-451 (1965)

2. Baird-Parker, A.C.
   A classification of Micrococci based on physiological and biochemical tests
   J. gen. Microbiol., 30., 409 (1963)

3. Baird-Parker, A.C.
   An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulasepositive staphylococci
   J. app. Bact., 25., 12, (1965)

4. Barber, M. and Kuper, A.
   Identification of staphylococcus pyogenes by the phosphatase reaction
   J. Path. Bact., 63., 57, (1951)

5. Becht, H.
   Vorschlag zur Mastitis Diagnostik
   Schweiz. Arch. f. Tierheilkunde, 627-630, (1961)

6. Blobel, H., Berman, D.T. and Simon, J.
   Purification of staphylococcal coagulase
   J. Bact., 79., 807-815, (1960)

7. Bryan, C.S.
   zit. nach Little and Plastridge (48)

8. Carantonis, L.M. and Spink, M.S.
   A selective saltagar medium for pathogenic staphylococci
   J. Path. Bact., 86., 217-220, (1963)

9. Chapman, G.H. and Behrens, C.
Crystalviolet agar as an differential medium for staphylococci
J. Bact., 29., 437-448, (1935)

10. Chapman, G.H.
The significance of sodium chloride in studies of staphylococci
J. Bact., 50., 201-203, (1945)

11. Chapman, G.H.
A single culture medium for selective isolation of plasmacoagulating staphylococci and for improved testing of chromogenesis, plasmacoagulation, mannitol fermentation and the stone reaction
J. Bact., 51., 409-410, (1946)

12. Chapman, G.H.
An improved Stone's medium for the isolation and testing of food poisoning staphylococci
Food Research, 13., 100-105, (1948)

13. Chapman, G.H.
Comparison of Ludlam's medium with staphylococcus medium 110 for the isolation of staphylococci that clot blood
J. Bact., 58., 823, (1949)

14. Christie, R., Atkins, N.E. and Munch-Petersen, E.
A note on a Lytic Phenomenon Shown by Group B Streptococci
Austral. J. exp. Biol. a. Med. Sci., 21., 197-200, (1944)

15. Cruickshank, R.
Staphylocoagulase
J. Path. Bact., 45., 295-303, (1937)

16. Davis, N.A. and Davis, G.H.G. — Selective culture of coagulasepositive Staphylococci. J. Path. Bact., 89., 380-386, (1965)

17. Deneke, A. and Blobel, H. — Fibrinogen media for Studies an Staphylococci. J. Bact., 83., 533-537, (1962)

18. Diernhofer, K. — Äskulinbouillon als Hilfsmittel für die Differenzierung von Euter- und Milchstreptokokken bei Massenuntersuchungen. Milchwirtschaftliche Forschungen, 13., 368-374, (1932)

19. Diernhofer, K. — Diagnostik der Euterentzündungen. Wien. Tierärztl. Mschr., 37., 809-866 (1950)

20. Mc Divitt, M.E. and Hussemann, D. — Comparison of three Media for the Isolation of Enterotoxogenic Micrococci. Amer. J. Pub. Health N.Y., 44., 1455-1459, (1954)

21. Duthie, E.S. and Lorenz, L.L. — Staphylococcal coagulase: Mode of action and antigenicity. J. Gen. Microbiol., 6., 95-100, (1952)

22. Edwards, S.J. — Studies on bovine mastitis. IX. A selective medium for the diagnosis of streptococcus mastitis. J. Comp. Path. Therap., 46., 211-217, (1933)

23. Edwards, S.J. — zit. nach Little und Plastridge (48)

24. Elek, S.D. and Levy, E.
Distribution of haemolysis in pathogenic nonpathogenic staphylococci
J. Path. Bact., 62., 541-554, (1950)

25. Esber, R.J. and Faulconer, R.J.
A medium for the initial visual demonstration of production of coagulase and fermentation of mannitol by pathogenic staphylococci
Tech. Bull. Registry Med. Technologists. 29., 108-110, (1959)

26. Feils, G.
Über die Pathogenität der in der Milch vorkommenden Staphylokokken
Arch. f. Lebensmittelhygiene, 8., 33-34, (1957)

27. Finegold, S.M. and Sweeney, E.E.
A new selective and differential medium for coagulasepositive staphylococci allowing rapid growth and strain differentiation

28. Fink, H.G.
Vergleichende diagnostische Untersuchungen zur routinemäßigen Differenzierung pathogener und apathogener vom Tier stammender Staphylokokken
Vet. med. Diss., München 1961

29. Gedek, W.
Zur Routinediagnostik in Milch vorkommender Staphylokokken und Mikrokokken
Arch. f. Lebensmittelhygiene, 17., 110-113, (1966)

30. Glenny, A.T. and Stevens, M.F.
Staphylococcus toxins and antitoxins
J. Path. Bact., 40., 201, (1935)

31. Hansen, A. and Olsen, S.J.
Fortsatte undersogelser over anvenddelsen of stafylokoktoksin ved undersogelsen of blandingsmaelk for mastitisstreptokokker
Nord. Vet. Med., 6., 965-978, (1954)

32. Hauge, St. and Ellingsen, J.K.
Et selektirt agarmedium (TKT-mediet) beregnet til pavisning av gruppe B-streptokokker i samlemelk
Nord. Vet. Med., 5., 539-547, (1953)

33. Hauke, H. und Schönherr, W.
Der milchhygienische Dienst in der DDR
Mh. Vet. Med., 19., 163-168, (1964)

34. Heeschen, W. und Meyer, A.
Biologische Merkmale aus Milch euterkranker und gesunder Kühe isolierter Micrococcaceae
Arch. f. Lebensmittelhygiene, 16., 151-155, (1965)

35. Hogh, P.
Coagulase-Positive, Toxigenic Udder Staphylococci
Nord. Vet. Med., 12., 588-598, (1960)

36. Hoeprich, D., Croft, M. and West, A.
zit. nach Davis and Davis (16)

37. Hoffmann, G.
Ein Beitrag zur Diagnostik von Staphylokokken mittels Bakteriophagen aus tierischem Material
Mh. Vet. Med., 14., 122, (1959)

38. Hotis, R.P. and Miller, W.T.
A simple method for detecting mastitis streptococci in milk
United States Dept. Agr. Circulat 400, (1936)

39. Hovmand, H.C. — Sun CAMP-Test for the Detection of Streptococcus agalactiae in Bulk-Milk. Nord. Vet. Med., 4., 901-907, (1952)

40. Jasper, D.E. and Dellinger, J.D. — A crystal violet agar for recognition of Streptococcus agalactiae from direct culture of milk. Cornell Veterinarian, 87-95, (Jan. 1967)

41. Kaffka, A. — Erfahrungen mit einfachen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Hyaluronidase, Fibrinolysin und Phosphatase bei Staphylokokken. Zbl. f. Bakt., I. Orig. 166., 381-385 (1957)

42. Mc Kenzie, D.A. — zit. Little und Plastridge (48)

43. Klastrup, O. — Krystalvioletagar til differentiering af stafylokokker, i solerde fra aseptisk udtagne in maelkeprover. Nord. Vet. Med., 7., 315-320 (1955)

44. Klemperer, R. and Haughton, G. — A medium for the rapid recognition of penicillin resistant coagulasepositive staphylococci. J. Clin. Path., 10., 96 (1956)

45. Klimmer, M., Haupt, H. und Roots, E. — zit. nach Diernhofer (19)

46. Kretzschmar, Chr. — Über den kulturellen Nachweis von Galtstreptokokken aus Einzel- und Sammelmilchen unter Ausnützung des CAMP-Phänomens. Arch. f. exp. Vet.Med., 13., 678-684 (1959)

47. Kuhlmann, W. — Zur routinemäßigen Diagnostik pathogener Staphylokokken. Arch. f. Lebensmittelhygiene, 9., 52-54, (1958)

48. Little, R.B. and Plastridge, W.N. — Bovine Mastitis. I st. ed. Mc Graw-Hill Book Co., New York 1946

49. Livoni, A. — zit. nach Obiger (57)

50. Lorenzen, P.. — Zur Frage des mikroskopisch nachweisbaren Eiters in der Milch. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 71., 53-55 (1958)

51. Ludlam, G.B. — zit. nach Davis und Davis (16)

52. Miller, W.T. — The Hotis test for the detection of mastitis bacteria in Milk. United States Dept. Agr. Circular 672, 1943

53. Mitscherlich, E. — Der bakteriologische Nachweis von Streptococcus agalactiae in Milchproben. Deutsch. Tierärztl. Wschr., 72., 297-302 (1965)

54. Müller, G. — Erfahrungen bei der Laboratoriumsdiagnose des gelben Galtes. Mh. Vet. Med., 20., 89-93 (1965)

55. Munch-Ptersen, E. and Christie, R. — On the effect of the Interaction of staphylococcal ß-Toxin and Group B-Streptococcal Substance on Red Blood Corpuscles and its Use as a Test for the identification of Streptococcus agalactiae. J. Path. Bact., 59., 367-371 (1947)

56. Obiger, G.

Qualitätsverbesserung der Milch durch Mastitisbekämpfung und hygienische Milchgewinnung

Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr., 70., 21-24, (1957)

57. Obiger, G.

Mastitisdiagnose

Kiel. Milchwirtsch. Forsch. Ber., 14., 307-325, (1962)

58. Packer, R.A.

zit. nach Little und Plastridge (48)

59. Plastridge, W.N. and Seremet, J.S.

Infectious bovine mastitis. A laboratory procedure for the detection of bovine mastitis

Storrs Agr. Expt. Sta. Bull. 224, 1938

60. Rackow, H.G.

Über die Diagnostik der Streptokokkenmastitis und ihre forensische Bedeutung

Kiel. Milchwirtsch. Forsch. Ber. 4., 595, (1952)

61. Renk, W.

Pathogenese der durch Staphylokokken hervorgerufenen Euterentzündungen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 74., 1-4 (1961)

62. Sandvik, O. and Hauge, St.

En kritisk analyse av T.K.T.-mediet met resulterende forbedringer

Nord. Vet. Med., 6., 225-268 (1954)

63. Schalm, O.W.

Merits and deficiencies of mastitis diagnostic methods

J. Am. Vet. Med. Ass. 105., 398-405 (1944)

64. Schalm, O.W.
A syllabus on the mammary gland in health and disease
Eigenverlag (ohne Jahresangabe)

65. Schalm, O.W. und Leidl, W.
Der Hotistest, eine einfache Methode zur Feststellung von Streptococcus agalactiae in der Milch
Tierärztl. Umsch., 15., 328-331 (1960)

66. Schalm, O.W. and Wood, G.M.
Micrococcus pyogenes in bovine milk I. Identification
Am J. Vet. Res., 14., 530 (1953)

67. Schönherr, W.
Tierärztliche Milchuntersuchung
Hirzel-Verlag Leipzig, 1965.

68. Seelemann, M. und Obiger, G.
CAMP-Test und TKT-Medium, ihre Bedeutung für Galtdiagnose und Galtbekämpfung
Milchwissensch. 11., 98-103 und 134-140 (1956)

69. Skorkovsky, B.
Selektivnährböden für Staphylokokken
Zbl. f. Bakt., I. Orig. 188., 558-560, (1963)

70. Slanetz, L.W. and Naghski, J.
Methods for the diagnosis and control of bovine mastitis
Agr. Expt. Sta. Tech. Bull. 72 (1939)

71. Stableforth, A.W.
Die Mastitiden der Rinder mit Berücksichtigung der Bekämpfung des Streptococcus agalactiae
Deutsch. Tierärztl. Wschr., 57., 253-258 (1950)

72. Steck, A.

zit. nach Diernhofer

Wien. Tierärztl. Mschr. 37., 809-866 (1950)

73. Szeremi, K.

Ein Nährboden zur schnelleren Diagnose der pathogenen Staphylokokken

Zbl. f. Bakt., I. Orig. 182., 560-561 (1961)

74. Terplan, G. und Gedek, W.

Zur Differenzierung von aus Rindereutern isolierten Micrococcaceae.

Arch. f. Lebensm. Hyg. 16., 203-207 (1965)

75. Thieme, D.

Beitrag zur bakterioskopischen Diagnose des Gelben Galtes

Mh. Vet. Med., 19., 733-735 (1964)

76. Tilgner, K. und Schierholz, H.

Zum Problem der laboratoriumsmäßigen Mastitisdiagnose

Milchwissensch., 8., 157-161 (1953)

77. Tolle, A.

Entwicklung leistungsfähiger kulturell-bakteriologischer Untersuchungsverfahren

Kiel. Milchwirtsch. Forsch. Ber., 18., 106-110 (1966)

78. Udall, D.H., Johnson, S.D. and Ferguson, J.

The control of mastitis in New York State

Vet. Rec., 50., 1417 (1938)

79. Vogler, A.

Zit. nach Diernhofer, K.

Wien. Tierärztl. Mschr., 37., 809-866 (1950)

80. Zebovitz, E. Tellurite-Glycine agar:
A selective plating medium for the quantitative detection of coagulasepositive staphylococci

J. Bact., 70., 686-690 (1955)

81. Zureck, F. und Dietrich, A. Ein Beitrag zur Differenzierung von Streptokokken aus Mastitismilch

Mh. f. prakt. Tierheilk. 4., 193-205 (1952)

82. Barber, M. and Kuper, A. Identification of staphylococcus pyogenes by the phosphatase reaction

J. of. Path. Bact. 63., 57 (1951)

Nach Abschluß meiner Arbeit möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. h. c. W. Baier aufrichtigen Dank zu sagen für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München die Untersuchungen durchzuführen.

Ebenso herzlich habe ich Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Walser für die wertvolle Anleitung und stets hilfsbereite Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas zu danken.

LEBENSLAUF

Am 24. September 1940 wurde ich als Sohn des Schulrates Max Hasenknopf und seiner Frau Franziska, geb. Freisl in Penzberg geboren. In meinem Heimatort Habach besuchte ich 5 Jahre lang die Volksschule und war daraufhin 9 Jahre im Albertinum in Tegernsee, wo ich auch 1960 an der Oberrealschule mein Abitur ablegte.

Im Anschluß daran begann ich im Wintersemester 1960 mein Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Nach 4 Semestern legte ich mein Physikum ab und schloß nach 9 Semestern im September 1965 mein Studium mit dem Tierärztlichen Staatsexamen.

Während meiner Praktikantenzeit arbeitete ich bei Dr. med. vet. R. Kerf in Kempen am Niederrhein und bekam am 28. März 1966 die Bestallung als Tierarzt. Von Mai bis August 1966 arbeitete ich als Praxisvertreter. Seit August 1966 war ich mit meiner Dissertationsarbeit beschäftigt.